

Document AL1
Oppl. No. To Be Assigned



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: 0 602 686 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 93120461.4

(51) Int. Cl. 5. B01D 11/02, A61K 45/05

(22) Anmeldetag: 17.12.93

(30) Priorität: 18.12.92 DE 4242902

(71) Anmelder: MADAUS Aktiengesellschaft
Ostmerheimer Strasse 198
D-51109 Köln(DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
22.06.94 Patentblatt 94/25

(72) Erfinder: Dr. Hajto, Tibor
Gempenstrasse 34
Ch-4104 Oberwil(CH)
Erfinder: Hostanska, Katarina, Dr. Chem.-Ing.
Steinweg 20
CH-4142 Münchenstein(CH)

(54) Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte
Mistellektinpräparate, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie diese enthaltende Arzneimittel und
deren Verwendung zur Erhöhung der natürlichen Immunresistenz und/oder in der Tumor-Therapie.

(57) Es werden Mistellektinkonzentrate mit einem hohen Anteil an immunologisch aktiven galaktoidspezifischen
Mistellektinen sowie entsprechende stabilisierte und standardisierte immunologisch aktive Mistellektinpräparate
beschrieben, es wird die Herstellung der Mistellektin-Konzentrate mittels eines zweistufigen Fraktionierungsver-
fahrens beschrieben, ferner die Herstellung der Mistellektin-Fraktionen enthaltenden Mistellektin-Präparate. Diese
Mistellektin-Präparate weisen einen definierten hohen Gehalt an immunologisch aktiven galaktoidspezifischen
Mistellektinen und eine definierte biologische Aktivität auf und erlauben dementsprechend eine exakt einstellbare
und auf den jeweiligen Behandlungszweck abgestimmte Dosierung. Sie werden vorteilhaft zur Erhöhung der
natürlichen Immunresistenz bei Menschen und Säugetieren und/oder für die Tumor-Therapie verwendet.

EP 0 602 686 A2

EP 0 602 686 A2

Die Erfindung betrifft Mistellektin-Konzentrate mit hohem Anteil an immunologisch aktiven galaktosid-spezifischen Mistellektinen aus wässrigen Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte immunologisch aktive Mistellektin-Fraktionen enthaltenden Präparate, ferner ein Verfahren zu ihrer Herstellung, wobei man wässrige Mistelextrakte einer fraktionierten Filtration unterwirft und die Endprodukte 5 standardisiert und stabilisiert sowie Arzneimittel enthaltend standardisierte, stabilisierte Präparate mit definiertem Gehalt an immunologisch aktiven Mistellektin-Fraktionen sowie die Verwendung dieser Mistellektine zur Herstellung eines Arzneimittels zur Erhöhung der natürlichen Immunresistenz bei Menschen und Säugetieren und/oder in der Tumor-Therapie.

Die Mistel (*Viscum album*) ist seit dem Altertum als Heil- und Zaubermittel bekannt; deren Extrakte 10 sowie Herba visci enthaltende Teemischungen sind auch heute noch als blutdrucksenkende, Cholin-ähnlich wirkende Mittel sowie als Mittel zur Behandlung von Arthrosen und rheumatischen Erkrankungen im Gebrauch. Außerdem ist die Verwendung von Mistelextrakten als krebshemmende Mittel in der **DD-A1-235 418** beschrieben worden. Wirksamer Bestandteil sind dabei als Lektine bezeichnete Inhaltsstoffe, bei denen es sich um Eiweißstoffe handelt, die sehr spezifisch Saccharide und Polysaccharide, auch in Lipid- oder 15 Protein-gebundener Form zu erkennen und zu binden vermögen. Die Spezifität der jeweils in Betracht kommenden Lektine hängt hauptsächlich von ihrer Abstammung ab und ist für ihre Verwendung in der Serodiagnostik und anderen Methoden der Biochemie und der Molekularbiologie von Bedeutung.

Mistelpflanzen und deren Extrakte enthalten drei Arten von toxischen Proteinen mit einer Spezifität für 20 den Kohlenwasserstoffanteil der Glucokonjugate, und zwar die Lektine ML I, ML II und ML III [Franz, H., Ziska, P., Kindt, A. **Biochem. J.**, **195** (1981) 481 bis 484]. Die Toxizität der Mistelextrakte wurde, zumindest anfänglich, der Anwesenheit eines galaktosidspezifischen Lektins (ML I) zugeschrieben [Holtskog, R., Sandvig, K., Olsnes, S. **Oncology**, **45** (1988) 172 bis 179]. Die zytotoxische Wirksamkeit von ML I wurde unter Verwendung von Kulturen von menschlichen peripheren mononukleären Blutzellen [PBMC] unter Anwendung von drei, von einander unabhängigen Methoden untersucht. Dabei wurde gefunden, dass die 25 Lebensfähigkeit von Zellen durch Lektinkonzentrationen $\geq 10 \text{ ng/kg}$ in signifikanter Weise beeinträchtigt wird. Dieser Wert für die Lektinkonzentration entspricht nur seinem biologisch aktiven, für die Bindung von Zucker verantwortlichen Teil, welcher mittels eines optimierten Enzymtests [Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. **Cancer Res.**, **49** (1989) 4803 bis 4808] bestimmt wurde. Bei Verabreichung in kleineren, nicht 30 toxischen Dosierungen zeigte ML I augenscheinlich eine leicht mitogene Wirkung und induzierte so eine Zunahme der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen [NK] gegenüber K₅₆₂-Zielzellen. Eine ähnliche NK-Zunahme wurde auch beobachtet, wenn für das Immunsystem nicht-toxische Lektin-Dosen verabreicht wurden. Die optimierte Anwendung von zuckerbindendem, aktivem Lektin in Mistelextrakten, bestimmt mittels ELLA, verstärkte verschiedene Abwehr-Mechanismen des Empfängers und ermöglichte eine Ver- 35 minderung des Tumorwachstums bei Patienten.

Die zytotoxische Wirkung von Mistelextrakten wurde, wie bereits erwähnt, hauptsächlich der Anwesenheit von ML I zugeschrieben. Zu einem geringeren Teil tragen andere Arten von Lektinen (ML II und ML III) sowie eine kleine Gruppe von stark basischen Proteinen mit einem Molekulargewicht von annähernd 5 kd, und zwar Viscotoxin A₂, A₃ und B zur zytotoxischen Wirkung von Mistelextrakten bei. ML I ist für D-Galaktose und ML III für N-Acetylaminogalaktosamin spezifisch, während ML II sowohl für D-Galaktose als 40 auch für N-Acetylaminogalaktosamin spezifisch ist. Die hohe Toxizität von Mistellektinen wurde ebenfalls bestätigt. Die LD₅₀-Werte liegen im Bereich von 0,001 bis 0,0001 g/kg [Franz, H. **Oncology**, **43**, Supplement 1, (1986) 23 bis 34 und Ziska, P., Gelbin, M., Franz, H. **Lectins, Vol. 8** (1991) im Druck]. Folglich kann die Anwendung höherer, toxischer und nicht optimierter Dosierungen von Mistellektinen eine 45 Suppressions-Wirkung auf verschiedene Abwehr-Mechanismen des Empfängers auslösen. Erfolgt jedoch die Anwendung in einer kleineren, für das Immunsystem nicht-toxischen Dosierung, ähnlich wie bei anderen Lektinen, so ist die Möglichkeit gegeben, dass Mistellektine in der Lage sind, eine immunmodulierende Antwort hervorzurufen [Franz, H. **Oncology**, **43**, Supplement 1 (I.c.) und Metzner, G., Franz, H., Kindt, A. Fahlbusch, B., Süss, J. **Immunbiol.**, **169** (1985) 461 bis 471]. In der Tat sind in dieser Weise optimierte 50 Dosierung von gereinigtem ML I befähigt, verschiedene Parameter des Abwehrsystems des Empfängers in vivo zu stimulieren [Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. **Cancer Res.**, **49**, (1989) 4803 bis 4808], was zumindest zum Teil durch eine Lektin-induzierte vermehrte Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha [TNF-alpha], Interleukin-1 [IL-1] und Interleukin-6 [IL-6] vermittelt wird [Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H.-J. **Cancer Res.**, **50** (1990) 3322 bis 3326]. Die Anwesenheit des spezifischen Zuckers (D-Galaktose) verminderte die Lektin-induzierte Freisetzung von Zytokinen aus menschlichen 55 peripheren mononukleären Blutzellen [PBMC] und bestätigte die Mitwirkung der Protein-Zucker-Wechselwirkung an diesen Immunantworten: Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H.-J. **[Cancer Res., 50 (I.c.)]**.

EP 0 602 686 A2

Aufgrund der starken Toxizität der Mistelextrakte bzw. der darin enthaltenen Lektine, insbesondere von ML I sowie aufgrund der Tatsache, dass die biologische Aktivität und die Wirkung auf das Immunsystem und damit die Verträglichkeit von Mistelextrakten und deren Inhaltstoffen in hohem Massse von deren Dosierung, insbesondere deren exakten und zuverlässigen Einstellung abhängt, ist es für Therapie und Prophylaxe von ausschlaggebender Bedeutung, dass Konzentrate von Mistelextrakten mit einem hohen Anteil an immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen und genau bekannter Zusammensetzung, vor allem mit genau bekannter Konzentration der wirksamen Inhaltsstoffe verfügbar gemacht und standardisierte Präparate einem genau definierten Gehalt an ausgewählten immunologisch aktiven Mistellektin-Fraktionen zur Verfügung gestellt werden. Da sich gezeigt hat, dass der Einsatz von Mistellektinen auf dem Gebiet der Tumor-Therapie erfolgversprechend ist, entstand eine starke Nachfrage nach hierfür geeigneten Mistellektin-Fraktionen und diese enthaltenden Präparaten.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, (a) Mistellektin-Konzentrate mit hohem Anteil an immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen und entsprechende standardisierte, stabilisierte Mistellektinpräparate für die Verwendung in der Tumor-Therapie und zur Erhöhung der natürlichen Immunresistenz, welche für die jeweilige therapeutische oder prophylaktische Verwendung notwendige eine exakte Dosierung ermöglichen, sowie (b) ein Verfahren zur Herstellung der Mistellektin-Konzentrate mit hohem Anteil an immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen sowie (c) ein Verfahren zur Herstellung der entsprechenden standardisierten Mistellektinpräparate.

Die gestellte Aufgabe wird gelöst, indem man

- 20 a) Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte Mistellektinpräparate mit einem definierten hohen Gehalt an immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen bestimmt als Mistellektin-I-Standard, wobei sich die Lektinmenge nur auf die biologisch aktiven Lektine bezieht, zur Verfügung stellt;
- 25 b) zur Herstellung von Mistellektin-Konzentraten mit hohem Anteil an immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen wässrige Mistelextrakte einer fraktionierten Filtration unter Verwendung unterschiedlicher Filter und Waschlösungen unterwirft, wobei man zwei Fraktionierungsstufen durchführt, wobei man in der ersten Fraktionierungsstufe einen unfermentierten wässrigen Mistelextrakt mindestens einer Ultrafiltration zur Gewinnung einer Fraktion mit Substanzen mit Molekularmassen von 20'000 bis 100'000 unterwirft, das durch Ultrafiltrationen erhaltene Konzentrat in der zweiten Fraktionierungsstufe mindestens einer Sterilfiltration unterwirft und das dabei erhaltene Endkonzentrat gegebenenfalls auf das gewünschte Endvolumen verdünnt und gegebenenfalls durch geeignete Stabilisatoren stabilisiert; und
- 30 c) zur Herstellung von standardisierten, immunologisch aktiven Mistellektinfraktionen enthaltende Präparate die biologische Aktivität der nach dem unter (a) beschriebenen Verfahren erhaltenen Mistellektin-Konzentrate bestimmt, die Konzentration der immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektine in der erhaltenen Fraktion bestimmt, die Fraktion mit einer physiologisch verträglichen Pufferlösung verdünnt, gegebenenfalls durch geeignete Stabilisatoren stabilisiert und auf den für die vorgesehene therapeutische Verwendung erforderlichen Lektingehalt einstellt, wobei der Lektingehalt in biologischen Einheiten angegeben wird, proportioniert, wobei jede Teilmenge die für die vorgesehene Verwendung in Therapie und/oder Prophylaxe erforderliche Dosismenge an biologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen enthält, und die Teilmenge einzeln unter sterilen Bedingungen in sterile und pyrogenfreie Ampullen einschließt oder gegebenenfalls lyophilisiert.

Eine Ausführung der unter (a) beschriebenen Produkte sind die Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte Mistellektinpräparate in Form einer Lösung mit einem Gehalt von 50 ng/ml bis 350 ng/ml an immunologisch aktiven, galaktosidspezifischen Mistellektinen und mit einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 und eine andere Ausführung ist eine entsprechende lyophilisierte Form.

Bei der Durchführung des unter (b) beschriebenen Verfahrens geht man vorteilhafterweise so vor, daß man in der ersten Fraktionierungsstufe zwei Ultrafiltrationen durchführt, wobei man für die erste Ultrafiltration ein steril mit bidestilliertem Wasser gewaschenes Polysulfonfilter mit 100'000 NMGT verwendet und die Filtration ohne Anwendung von Druck durchführt und anschließend das erhaltene Filtrat zweimal mit einer Pufferlösung wäscht, und daß man für die zweite Ultrafiltration ein steril mit bidestilliertem Wasser gewaschenes Celluloseacetatfilter mit 20'000 NMGT verwendet und die Filtration ohne Anwendung von Druck durchführt.

Nach der ersten Fraktionierungsstufe führt man zweckmäßigerweise eine Sterilfiltration unter Verwendung eines Filters mit einer Selektionsgrenze 0,2 µm bei maximal 600 kPa als zweite Fraktionierungsstufe durch.

In der Regel arbeitet man im Bereich von pH-Wert 7,0 bis 7,5.

EP 0 602 686 A2

Bevorzugt führt man die erste und die zweite Fraktionierungsstufe unmittelbar aufeinanderfolgend innerhalb von 2 Stunden durch.

Das am Ende der zwei Fraktionierungsstufen erhaltene Endkonzentrat wird vorteilhafterweise auf ein vorgegebenes Volumen verdünnt, ggf. durch geeignete Stabilisatoren stabilisiert und zur Aufbewahrung in sterile, pyrogenfreie Ampullen eingeschlossen oder gegebenenfalls lyophilisiert.

Zur Stabilisierung der bereits verdünnten Lösung werden Stabilisatoren zugesetzt. Diese können Alkanole speziell Polyoole und deren Derivate, wie z.B. Kohlenhydrate wie Glucose, Saccharose, Cyclodextrine, derivatisierte Cyclodextrine, Pentaerythrit, Mannit, Sorbit und Polyhydroxyfettsäuren wie Polymilchsäure und Polymilchsäureester, als auch andere hydrophile Polymere wie Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, 10 als auch Aminosäuren oder Proteine wie Glycin oder Albumin spez. Humanserumalbumin sein.

Bei der Durchführung des unter (c) beschriebenen Verfahrens geht man zweckmäßigerweise so vor, daß man die Bestimmung der biologischen Aktivität mit Hilfe von drei unabhängigen Testmethoden in vivo durchgeführt, wobei man den Anteil an zuckerbindenden aktiven Lektinen unter Anwendung eines optimierten Enzym-Tests bestimmt, die Zellvitalität in einer Kultur von menschlichen peripheren mononukleären 15 Zellen [PMNC] mittels Trypanblau und Fluoresceindiacetat, welches zu Fluorescein hydrolysiert wird, ermittelt und bei lektinempfindlichen Leukämiezellen [K 562] die Aufnahme von [³H]-Thymidin bestimmt.

Die Stabilisierung kann man alternativ bei (c) nach der Verdünnung mit einer physiologisch verträglichen Pufferlösung und vor der Einstellung auf den für die vorgesehene therapeutische Verwendung erforderlichen Lektингehalt vornehmen.

20 Die Standardisierung der erhaltenen, biologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinfaktionen enthaltenden Präparate wird vorteilhafterweise anhand der aus der Bestimmung der biologischen Aktivität erhaltenen Werte vorgenommen.

Bei der Standardisierung ist festzustellen, daß die bestimmten Einheiten (1 ng) eine biologisch aktive Lektinmenge bedeutet und nicht anwesender Mistellektin-I-Standard-Proteininhalt.

25 Die biologische Aktivität wird u.a. mit nachfolgenden Untersuchungen gemessen:

- 1) Der Gehalt an zuckerbindenden Lektinen wird durch ein Enzymtest ELLA (Enzym-Linked-Lektin-Assay) bestimmt.
- 2) Messung der zytotoxischen Wirkung auf Humanlymphozyten.
- 3) Messung der Wirkung auf NK-Zellen in vivo.

30 Die Erfindung wird nachfolgend anhand der beispielhaften Beschreibung der Herstellungsverfahren und der Beschreibung der Versuche zur Bestimmung der biologischen bzw. immunologischen Aktivität sowie anhand der Zeichnung erläutert. Diese zeigt die maximale Zunahme der lektin-induzierten zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen in vivo nach 24 bis 72 Stunden nach einmaliger Injektion von ML I, in schaubildlicher Darstellung.

35 BESCHREIBUNG DER HERSTELLUNGSVERFAHREN

Herstellung der Mistellektin-Konzentrat

40 Für die Durchführung des Verfahrens wird zweckmäßigerweise ein Sartocon-Mini-Crossflow-System von Sartorius GmbH verwendet. Dieses ist ein modulares Ultra- und Mikrofiltrationssystem für die Aufkonzentrierung und Abtrennung von Proteinen und einer Reihe von anderen Substanzen. Dabei wird ein wässriger Mistelektinklarkt, wie er durch Extraktion von frischen oder getrockneten Mistelblättern mit Wasser oder im Falle von frischen Blättern, mit einer wässrigen Pufferlösung (PBS 1%) gewonnen wird, mittels einer 45 Schlauchquetschpumpe mit einer Förderleistung von 100 bis 900 Liter/Stunde aus einem Vorlagegefäß in das System eingebracht und durch die einzelnen Filterstufen gefördert. Das nach dem Passieren von einem oder mehreren Filtern erhaltene Filtrat wird entweder in einem Sammelgefäß aufgefangen oder zum weiteren Konzentrieren in das Vorlagegefäß zurückgeleitet und von dort erneut in das System eingebracht. Der in das System eingebrachte wässrige Extrakt, der vorteilhafterweise auf pH 7 eingestellt ist, wird 50 zunächst einer ersten Ultrafiltration unter Verwendung eines steril mit bidestilliertem Wasser gewaschenen Polysulfonfilter mit 100 000 NMGT unterworfen. Diese Ultrafiltration wird zweckmäßigerweise ohne Anwendung von Druck durchgeführt. Das erhaltene Filtrat wird vorzugsweise einer zweiten Ultrafiltration unter Verwendung eines ebenfalls steril mit bidestilliertem Wasser gewaschenen Celluloseacetatfilters mit 20 000 NMGT unterworfen, wobei diese Ultrafiltration ohne Druckanwendung durchgeführt wird. Das dabei erhaltenne Konzentrat wird gesammelt, gegebenenfalls zwischenzeitlich unter sterilen Bedingungen in Ampullen eingeschlossen, und mindestens einer Sterilfiltration unterworfen. Die Sterilfiltration wird zweckmäßigerweise unter Verwendung eines Membranfilters mit einer Selektionsgrenze bei 0,2 µm durchgeführt.

EP 0 602 686 A2

Herstellung der standardisierten Präparate

Der nach der Sterilfiltration erhaltene Extrakt wird nach der Bestimmung seines Gehaltes an biologisch aktivem Lektin oder biologisch aktiven Lektinen in der weiter unten beschriebenen Weise auf die optimale Verdünnung eingestellt und unter sterilen Bedingungen in Ampullen eingefüllt. Die Verdünnung hängt dabei von der ermittelten biologischen Aktivität, die in "Biologischen Einheiten" ausgedrückt und auf den Ampullen vermerkt wird, und dem beabsichtigten Verwendungszweck des damit hergestellten Präparates ab. Die in der beschriebenen Weise erhaltenen standardisierten Präparate enthalten genau definierte Mengen an immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen und erlauben deren exakte Dosierung, so dass sowohl eine Schädigung des Patienten durch eine ungewollte Überdosierung wie auch eine durch eine zu niedrige Dosierung verursachte Unwirksamkeit auszuschließen sind.

Die zur Herstellung der Mistellektin-Konzentrate der eingangs erwähnten Art durchzuführenden Fraktionsstufen werden zweckmässigerweise unmittelbar aufeinanderfolgend durchgeführt, wobei ebenso wie bei der nachfolgenden Herstellung der standardisierten Präparate auf die strikte Einhaltung steriler Bedingungen zu achten ist.

Stabilisierung der verdünnten bzw. gepufferten Lösung

Zur Erhaltung der galaktosidspezifischen Mistellektinaktivität wird ein Stabilisator im Bereich von 0,1 mg/ml bis 10 mg/ml, vorzugsweise 5 mg/ml, zugesetzt.

Hierfür geeignete Stabilisatoren sind Alkanole speziell Polyole und deren Derivate, wie z.B. Kohlenhydrate wie Glucose, Saccharose, Cyclodextrine, derivatisierte Cyclodextrine, Pentaerythrit, Mannit, Sorbit und Polyhydroxyfettsäuren wie Polymilchsäure und Polymilchsäureester, als auch andere hydrophile Polymere wie Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, als auch Aminosäuren oder Proteine wie Glycin oder Albumin spez. Humanserumalbumin.

BESTIMMUNG DER BIOLOGISCHEN BZW. IMMUNOLOGISCHEN AKTIVITÄT

Untersuchungen in vitro

Materialien und Methoden

Für die Untersuchung wurden aus Mistelpflanzen gewonnene Extrakte verwendet, aus denen Mistellektine isoliert wurden. Der Gehalt an zuckerbindenden Lektinen wurde mittels eines Enzymtestes - Enzym-Linked-Lektin-Assay [ELLA] -, wie früher von Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. [**Cancer Res.**, **49** - (1989) 4803 bis 4808] beschrieben, bestimmt. Für diese Untersuchung wurden ausserdem polyklonale Antikörper gegen Periodat-oxydiertes, mit Formaldehyd behandeltes ML I und Asialofetuin (Typ I) (von Sigma, St. Louis, USA) verwendet.

Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen

Menschliche periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden von verschiedenen Spendern mittels Gradientenzentrifugation nach Ficoll isoliert. Nach dem Waschen wurden die PMBC in serum-freiem Hybridom-Medium mit niedrigem Proteingehalt (von GIBCO BRL AG, Basel, Schweiz), welches mit L-Glutamin (2 mM) und 50 µg/ml Gentamycin ergänzt worden war, suspendiert. Die Zellen wurden in flachbodigen Mikro-Titerplatten (96 Vertiefungen) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Agentien, wie nachfolgend bei der Diskussion der Ergebnisse angegeben, während 24 Stunden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit einem Gehalt von 5% CO₂ inkubiert. Unabhängig davon wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mittels des Trypan-Blau-Ausschlusstests sowie der Aufnahme von Fluoresceinacetat und dessen nachfolgender Hydrolyse zu Fluorescein bestimmt.

Bestimmung der Zytotoxizität

Die Untersuchung der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen, nachfolgend als NK-Zytotoxizität bezeichnet, wurde wie im Detail von Hajto, T. Hostanska, K., Gabius, H.-J. [**Cancer Res.**, **49** (I.c.)] und Hajto, T., Hostanska, K. [**Clin. Trials J.**, **22** (1985) 514 bis 520] beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden mononukleäre Zellen mittels des Ficoll-Hypaque-Gradienten isoliert. Eine vorgegebene Menge NK-sensitiver K₅₆₂-Zielzellen, nämlich $2,5 \times 10^3$ Zellen, wurden zu Effektorzellen in unterschiedlichen Konzentrationen hinzuge-

EP 0 602 686 A2

fügt, um im Endeffekt Mischungsverhältnisse von Effektorzellen zu Zielzellen von 100:1, 50:1, 25:1 und 10:1 in einem Endvolumen von 200 µl pro Vertiefung zu erhalten. Unmittelbar nach der Herstellung der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen 2 µCi [Methyl-³H]-thymidin (spez. Aktivität: 25 Ci/mMol) eingebracht. Nach einer Inkubationsdauer von 18 bis 20 Stunden wurden die Zellen geerntet und die [³H]-Thymidin-Aufnahme mittels eines Szintillationszählers quantitativ bestimmt. Die spontane Aufnahme der markierten Substanz stand in Beziehung zur Aktivität der Zielzellen. Der Prozentsatz der spezifischen Hemmung (Pi), ausgedrückt durch den cytotoxischen Index der Effektorzellen wurde nach der folgenden Formel berechnet:

10

$$Pi = \frac{(1 - \frac{\text{Testaufnahme}}{\text{Spontane Aufnahme}})}{100}$$

15

Der [³H]-Thymidineinbau in die Effektorzellen wurde ebenfalls in ähnlicher Weise bestimmt. Da der hierbei erhaltene Wert jedoch vernachlässigbar niedrig war, konnte dieser Faktor ausser Betracht gelassen werden. Die Anzahl von Effektorzellen, die eine spezifische Hemmung von 33% (Pi - 33) ergaben, wurde mittels eines halblogarithmischen Massstabes berechnet. Diese Pi 33-Werte wurden als wertvolles Hilfsmittel für den Vergleich verschiedener experimenteller Resultate verwendet und als spezifische Zytotoxizität ausgedrückt. Darüberhinaus wurden morphologische Untersuchungen in den für die NK-Untersuchungen isolierten mononukleären Zellpopulationen durchgeführt. Für andere Zellen als Lymphozyten wurde ein Korrekturfaktor ermittelt. Für In-vivo-Untersuchungen der NK-Aktivität wurde eine Gruppe von 12 weissen New Zealand-Kaninchen (NZW) eingesetzt.

25

Eine Kontamination durch Endotoxine wurde rigoros ausgeschlossen, wie ausführlich von Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. [Cancer Res., 49 (I.c.)] beschrieben. Alle Daten wurden unter Anwendung einer statistischen Methode, und zwar mittels des t-Tests nach Student ermittelt.

30 Lebensfähigkeit von menschlischen peripheren mononukleären Blutzellen in Gegenwart von Mistellektin I (ML I)

Zur Erläuterung der zytotoxischen und/oder zytostatischen Wirkung von ML I wurde die Lebensfähigkeit von PBMC in vitro in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des Lektins bestimmt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Lektin-Konzentrationen ≥ 10 ng/ml signifikant ($p < 0,05$) beeinträchtigt, vgl.: Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf C., Gabius, H.-J. [Cancer Res., 50 (I.c.)]. Bei Anwendungen kleinerer, nicht-toxischer Gaben zeigte ML I eine leicht mitogene Wirkung, was mit den Erkenntnissen anderer Autoren (Franz, H., Oncology, 43, Supplement 1, (1986) 23 bis 24; Metzner, G., Franz, H., Kindt, A., Fahlbusch, B., Süss, J., Immunbiol., 169 (1985) 461 bis 471; Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D., Uhlenbrück, G. Int. J. Biochem., 11 (1980) 429 bis 435] im Einklang steht. Die optimale Immunantwort hinsichtlich der Lymphozytenvermehrung mit einem Stimulations-Index von 1,7 wurde bei einer Lektinkonzentration von 0,01 ng/ml gefunden. Sowohl die zytotoxische wie auch die mitogene Wirkung wurden bei Anwesenheit des spezifischen Zuckers (D-Galaktose) durch Verhinderung der Lektin-Bindung aufgehoben. Daraus folgt die Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenwasserstoffen im Verlauf der zellulären Reaktionen von ML I.

45

Wirkungen von Mistellektinen auf NK-sensitive Zielzellen [K₅₆₂] und auf die NK-Zytotoxizität in vitro

K₅₆₂-Zellen sind menschliche myeloische Leukämiezellen, die gegenüber der Zytotoxizität von NK-Zellen in hohem Maße empfindlich sind und in weitem Rahmen für die Bestimmung der NK-Aktivität von PMBC verwendet werden. In der Kultur von K₅₆₂-Zellen zeigten alle drei Arten von Mistellektinen eine verhältnismässig starke zytotoxische Wirksamkeit, [Hajto, T., Hostanska, K.; Interlec Meeting, Berlin 1991]. Die oben erwähnte Überempfindlichkeit gegenüber Lektinen wurde auch in Kulturen anderer Leukämiezellen (MOLT 4) beobachtet [Ribereau-Gayon, G., Jung, M.L., DiScala, D., Beck, J-P. Oncology, 43, Supplement 1, (1986) 35 bis 41]. Im Gegensatz zu diesen Tumor-Zelllinien zeigte ML I in Kulturen von gesunden menschlichen PMBC zytotoxische Wirkungen, die um drei bis vier Größenordnungen kleiner waren als die in Kulturen von Leukämiezellen gefundenen. Folglich ist es nicht überraschend, dass Mistellektine, wenn sie in niedrigen, für die Lymphozyten nicht-toxischen und leicht mitogenen, für die Zielzellen jedoch toxischen Konzentrationen inkubiert werden, die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen

EP 0 602 686 A2

gegenüber K₅₆₂-Zellen erhöhen können, [Hajto, T., Hostanska, K.: **Interlec Meeting**, Berlin 1991]. Es war daher von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob es die In-vivo-Ueberwachung von NK-Zellen ermöglicht, für das Immunsystem nichttoxische und für die klinische Anwendung geeignete optimale Lektin-Dosierungen, die in Form von Mistelextrakten an Tumorpatienten verabreicht werden können, zu finden.

5

Untersuchungen in vivo

Wirkung von Mistellektin I auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen in vivo

10 Um die möglicherweise vorhandene Bedeutung des NK-Assays für die nützliche Anwendung von Mistellektinen in der Klinik zu bestätigen, wurde als nächster Schritt die Wirkung unterschiedlicher Dosierungen von ML I bei einer Gruppe von NZW-Kaninchen untersucht. Die maximale Zunahme der NK-Aktivität wurde zwischen 24 und 72 Stunden nach einer einzelnen intravenösen Injektion beobachtet und zeigte, dass die von der angewandten Dosierung abhängigen Immunantworten in vivo, den in vitro 15 gefundenen ähnlich waren [Hajto, T., Hostanska, K: **Interlec Meeting**, Berlin 1991], wie aus der Figur, welche die Abhängigkeit der Zunahme der NK-Aktivität im peripheren Blut von NZW-Kaninchen zwischen der 24. und 72. Stunde nach einer einmaligen intravenösen Injektion von der verabreichten Dosierung zeigt, ersichtlich ist. Daraus geht hervor, dass die Herabsetzung der für das Immunsystem toxischen Lektin-Dosierungen in einem Auftreten einer NK-stimulierenden Wirkung, mit einem Optimum bei 0,8 ng/kg bei 20 Kaninchen resultiert, die um vier bis fünf Größenordnungen niedriger ist als der LD₅₀-Wert von ML I. Darüberhinaus wurde eine ähnlich optimale Dosierung dieser Komponente des Extraktes bei Patienten [1 ng/kg] gefunden, die mit einem, aufgrund des Gehaltes an zuckerbindendem Lektin standardisierter Mistelektinkt behandelt worden waren: Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, G.H. [**Therapeutikon**, 4 (1990) 136 bis 145]. Sowohl die NK-Aktivität wie auch die Häufigkeit der im Blut zirkulierenden LGL Zellen wurden 25 durch ML I stimuliert: Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. [**Cancer Res.**, 49 (I.c.)].

Vergleich der Wirkung von Mistellektinen (ML I und ML II) auf die NK-Zytotoxizität in vivo

Es wurde in fundierter Weise erwiesen, dass die drei, in Mistelextrakten enthaltenen, Arten von Lektinen (ML I, ML II und ML III) untereinander in Wechselwirkung stehen. Diese Tatsache muss bei deren 30 Bestimmung mittels ELISA oder ELLA in Betracht gezogen werden: Ziska, P., Franz, H. [**Lectins, Vol. IV** - (1985) 473 bis 480]. Trotz der Tatsache, dass der Anteil von ML II und ML III in Mistelpflanzen und einer grossen Zahl von deren Extrakten nur etwa 15% der Gesamtmenge von ML I beträgt, vgl. Ziska, P., Franz, H. [**Lectins, Vol. IV** (I.c.)] können gewisse Änderungen ihrer Mischungsverhältnisse als Folge des 35 Herstellungsprozesses bei verschiedenen Extrakten (ISCADOR) nicht ausgeschlossen werden. Folglich ist für eine therapeutische Anwendung dieser Extrakte eine Untersuchung der immunmodulierenden Wirksamkeit von ML II und ML III ebenfalls notwendig. ML III war bei der Verabreichung in der gleichen Dosierung, wie sie sich für ML I als optimal erwiesen hatte, nicht in der Lage die NK-Zytotoxizität in Kaninchenblut signifikant zu stimulieren ($p>0,05$). Im Gegensatz zu ML III zeigte ML II signifikante ($p<0,025$) jedoch 40 quantitativ weniger ausgeprägte Wirkungen auf die NK-Aktivität bei Verabreichung in geeigneten Dosierungen im Vergleich zu ML I: Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J., [**Cancer Res.**, 49 (I.c.)].

Wirkung von Mistellektin I auf das Netzwerk von Zytokinen und Lymphokinen

45 Durch Ueberwachung von NK-Zellen wurde eine optimale Anwendung von Mistellektin gefunden, durch die zahlreiche Parameter des Abwehrsystems des Empfängers stimuliert werden können [Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H.-J. [**Cancer Res.**, 49 (I.c.)] und Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, G.H., **Therapeutikon** 4, (I.c.)] und die auf die mögliche Rolle der Zytokine schliessen lassen. Diese Annahme konnte in einer früheren Studie verifiziert werden: Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H.-J. [**Cancer Res.**, 50 (I.c.)]. Bei Herabsetzung der zytotoxischen Konzentration von ML I in einer Kultur von menschlichen PBMC auf einen Bereich, der für Lymphozyten nicht toxisch ist, wurde eine vermehrte Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) beobachtet. Diese durch Lektin vermehrte Sekretion von Zytokinen hängt von der spezifischen Bindung des Lektins an zelluläre Glucokonjugate ab. Darüberhinaus wurden die Serumspiegel von TNF-alpha und IL-6 bei acht Krebspatienten nach der Injektion eines Extraktes mit einem optimalen Lektингehalt (1 ng/kg) erhöht.

Diese, das Zytokin-Netzwerk betreffenden Untersuchungen sind bisher nicht zu Ende geführt worden, es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass TNF-alpha, IL-1 und IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Lektin-induzierter Verstärkung verschiedener Abwehrmechanismen des Empfängers spie-

EP 0 602 686 A2

len. Eine Lektin-induzierte NK-Vermehrung kann auch der vermehrten Freisetzung von IL-1, IL-6 und THF-alpha zugeordnet werden, welche in der Lage ist, die Wechselwirkung zwischen IL-2-Rezeptoren auf NK-Zellen und IL-2 (Verstärkung der CD25-Ausprägung und IL-2-Synthes) zu verstärken. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Fragen sind im Gange.

5

Zusammenhang zwischen durch Mistellektine vermittelter immunmodulierender Wirkung und Antitumoraktivität

- Nach der Bestimmung der optimalen immunmodulierenden Dosis von Mistellektin erhob sich die Frage,
- 10 ob das Lektin eine Antitumor-Wirkung hervorrufen kann, wenn es für eine Langzeitanwendung eingesetzt wird. Im Laufe von Untersuchungen mit unterschiedlichen Dosierungen von ML I zeigte sich, dass nur die optimale Dosierung (1 ng/kg) eine Verringerung des Tumorgewichts bei nackten Mäusen mit einer Fremdtransplantation von menschlichem Tumor [Steinberg et al., Universität Essen (BRD), unveröffentlichte Daten] bewirkte. In ähnlicher Weise waren Mistelextrakte, die aufgrund des Gehaltes an Zucker-bindendem
- 15 Lektin standardisiert und entsprechend einem optimierten Dosierungsschema verabreicht worden waren, in der Lage, bei Patienten mit Tumoren in fortgeschrittenem Krankheitsstadium eine Antitumor-Aktivität zu induzieren [Hajto, T., Hostanska, K., Fornalski, M., Kirsch, A. *Dtsch. Zeitschr. Onkol.*, 23 (1991) 1 bis 6]. Darüberhinaus zeigten Untersuchungen an Tiermodellen eine Schutzwirkung von ML I auf das NK-System bei seiner Verabreichung in Kombination mit einer Strahlentherapie, wie unveröffentlichte Daten, die in
- 20 Einklang mit klinischen Beobachtungen sind, zeigten: Hajto, T., Hostanka, K., Gabius G.H. [*Therapeutikon*, 4 (I.c.)].

ERGEBNISSE UND DARAUS ZU ZIEHENDE SCHLUSSFOLGERUNGEN

25 Die vorstehenden Ausführungen, die sich auf im Laufe der beschriebenen Untersuchungen erhaltene Ergebnisse stützen, machen deutlich, dass eine Überwachung des NK-Systems, hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität und/oder der Häufigkeit der im Blut zirkulierenden NK-Zellen, es ermöglichen kann, optimale Dosierung für hoch-toxische Mistellektine, wie sie in Mistelextrakten enthalten sind und die eine Stimulation der Abwehrmechanismen eines Empfängers bewirken können, anzugeben.

30 Die genannten Ergebnisse lassen außerdem mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit vermuten, dass für die Antitumor-Aktivität der Mistellektine sowohl deren zytotoxische Aktivität wie auch deren immunmodulierende Wirksamkeit notwendig sind.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen auch erkennen, daß die Verabreichung von standardisierten, stabilisierten Mistellektin-Präparaten mit aufgrund ihrer biologischen Aktivität genau definiertem Gehalt an 35 biologisch aktiven Mistellektinen nach einem optimierten Dosierungsplan eine Verwendung in der Tumor-Therapie und zur Bekämpfung anderer Krankheiten, z.B. durch Erhöhung der natürlichen Immunresistenz, empfehlenswert erscheinen läßt.

Patentansprüche

40

1. Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte Mistellektinpräparate mit einem definierten hohen Gehalt an immunologisch aktiven, galaktospezifischen Mistellektinen, bestimmt als Mistellektin-I-Standard, wobei sich die Lektinmenge nur auf die biologisch aktiven Lektine bezieht.

45

2. Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte Mistellektinpräparate nach Anspruch 1 in Form einer Lösung mit einem Gehalt von 50 ng/ml bis 350 ng/ml an immunologisch aktiven, galaktosidspezifischen Mistellektinen und mit einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5.

50

3. Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte Mistellektinpräparate nach den Ansprüchen 1 und 2, in lyophilisierter Form.

55

4. Verfahren zur Herstellung von Mistellektin-Konzentraten nach den Ansprüchen 1 bis 3 aus wäßrigen Mistelextrakten, wobei man wäßrige Mistelextrakte einer fraktionierten Filtration unter Verwendung unterschiedlicher Filter und Waschlüssigkeiten unterwirft, dadurch gekennzeichnet, daß man zwei Fraktionierungsstufen durchführt, wobei man in der ersten Fraktionierungsstufe einen unfermentierten wäßrigen Mistelextrakt mindestens einer Ultrafiltration zur Gewinnung einer Fraktion mit Substanzen mit Molekularmassen von 20'000 bis 100'000 unterwirft, das durch Ultrafiltration erhaltene Konzentrat in der

EP 0 602 686 A2

zweiten Fraktionierungsstufe mindestens einer Sterifiltration unterwirft und das dabei erhaltene Endkonzentrat gegebenenfalls auf das gewünschte Endvolumen verdünnt und gegebenenfalls stabilisiert.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man in der ersten Fraktionierungsstufe zwei Ultrafiltrationen durchführt, wobei man für die erste Ultrafiltration ein Polysulfonfilter mit 100'000 NMGT verwendet und anschließend das erhaltene Filtrat zweimal mit einer Pufferlösung wäscht, und daß man für die zweite Ultrafiltration ein Celluloseacetatfilter mit 20'000 NMGT verwendet.
10. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß man in der zweiten Fraktionierungsstufe zwei Sterifiltrationen durchführt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß man im Bereich von pH 7,0 bis 7,5 arbeitet.
20. 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die erste und die zweite Fraktionierungstufe unmittelbar aufeinanderfolgend innerhalb von 2 Stunden durchführt.
25. 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8 dadurch gekennzeichnet, daß man das erhaltene Endkonzentrat oder die erhaltene Endlösung nach optativer Stabilisierung lyophilisiert.
30. 10. Verfahren zur Herstellung von standardisierten, immunologisch aktiven Mistellektinfaktionen enthaltenen Präparaten nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die biologische Aktivität der nach dem Verfahren nach Patentanspruch 4 erhaltenen Mistellektin-Konzentrate bestimmt, die Konzentration der immunologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektine in der erhaltenen Fraktion bestimmt, die Fraktion mit einer physiologisch verträglichen Pufferlösung verdünnt und gegebenenfalls stabilisiert, auf den für die vorgesehene therapeutische Verwendung erforderlichen Lektингehalt einstellt, wobei der Lektингehalt in biologischen Einheiten angegeben wird und portioniert, wobei jede Teilmenge die für die vorgesehene Verwendung in Therapie und/oder Prophylaxe erforderliche Dosismenge an biologisch aktiven galaktosidspezifischen Mistellektinen enthält, und die Teilmengen einzeln unter sterilen Bedingungen in sterile und pyrogenfreie Ampullen einschließt.
35. 11. Verfahren nach den Ansprüchen 4, 8, 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stabilisatoren Alkanole speziell Polyole und deren Derivate, wie z.B. Kohlenhydrate wie Glucose, Saccharose, Cyclodextrine, derivatisierte Cyclodextrine, Pentaerythrit, Mannit, Sorbit und Polyhydroxyfettsäuren wie Polymilchsäure und Polymilch säureester, als auch andere hydrophile Polymere wie Polyvinylpyrrolidin, Polyvinylalkohol, als auch Aminosäuren oder Proteine wie Glycin oder Albumin speziell Humanserumalbumin verwendet.
40. 12. Verfahren nach den Ansprüchen 4, 8, 9, 10 und 11, da durch gekennzeichnet, daß man die Stabilisatoren in einer Menge im Bereich von 0,1 mg/ml bis 10 mg/ml, vorzugsweise 5 mg/ml, der verdünnten oder gepufferten Lösung zusetzt.
45. 13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bestimmung der biologischen Aktivität mit Hilfe von drei unabhängigen Testmethoden *in vitro* durchführt, wobei man den Anteil an zuckerbindenden aktiven Lektinen unter Anwendung eines optimierten Enzym-Tests bestimmt, die blau und Fluoresceindiacetat, welches zu Fluorescein hydrolysiert wird, ermittelt und die Aufnahme von [³H]-Thymidin bei lektinempfindlichen Leukämiezellen [K₅₆₂] bestimmt.
50. 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Standardisierung der erhaltenen, biologisch aktiven galaktosidspezifische Mistellektinfaktion enthaltenden Präparate anhand der aus der Bestimmung der biologischen Aktivität Werte vornimmt.
55. 15. Standardisierte, stabilisierte Mistellektinpräparate mit definiertem Gehalt an immunologisch aktiven, galaktosidspezifischen Mistellektinen definierter biologischer Aktivität, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 14.
16. Arzneimittel, enthaltend standardisierte, stabilisierte Mistellektine nach den Ansprüchen 1 bis 3 oder 15.

EP 0 602 686 A2

17. Verwendung der Mistellektine nach den Ansprüchen 1 bis 3 oder 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Erhöhung der natürlichen Immunresistenz bei Menschen und Säugetieren und/oder für die Tumor-Therapie.

5

10

15

20

25

30

35

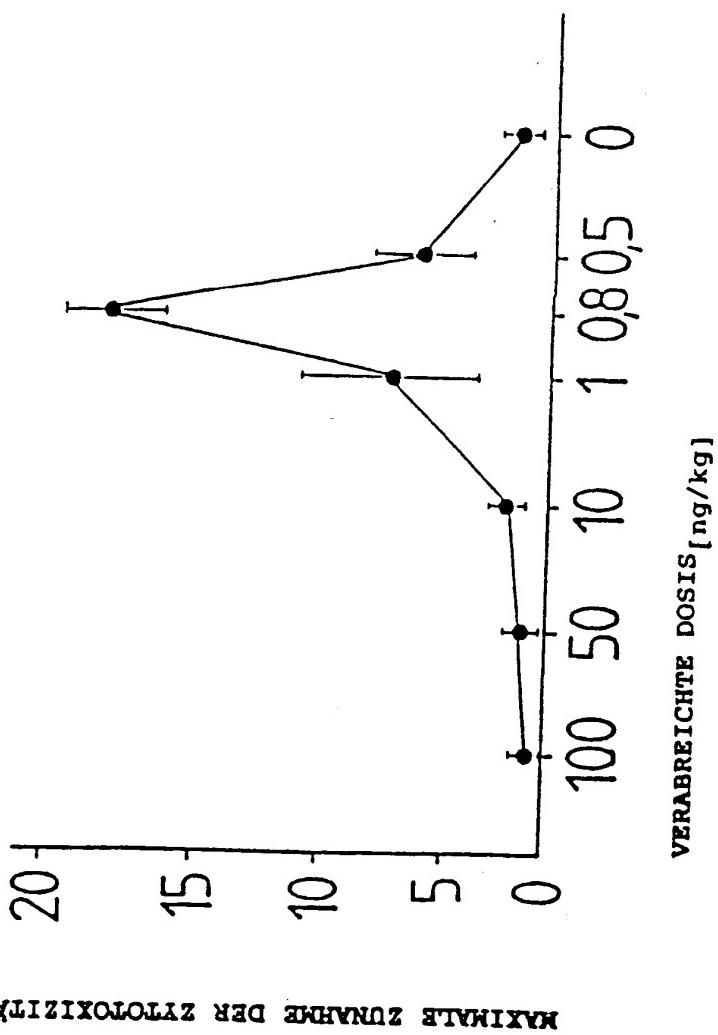
40

45

50

55

EP 0 602 686 A2





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 602 686 A3**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: **93120461.4**

⑮ Int. Cl.⁶: **A61K 35/78, A61K 45/05**

⑭ Anmeldetag: **17.12.93**

⑯ Priorität: **18.12.92 DE 4242902**

⑰ Anmelder: **MADAUS Aktiengesellschaft
Ostmerheimer Strasse 198
D-51109 Köln (DE)**

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
22.06.94 Patentblatt 94/25

⑲ Erfinder: **Dr. Hajto, Tibor
Gempenstrasse 34
CH-4104 Oberwil (CH)**
Erfinder: **Hostanska, Katarina, Dr. Chem.-Ing.
Steinweg 20
CH-4142 Münchenstein (CH)**

⑯ Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

⑯ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **03.05.95 Patentblatt 95/18**

⑳ **Lektinkonzentrate aus Mistelextrakten und entsprechende standardisierte, stabilisierte
Mistellektinpräparate, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie diese enthaltende Arzneimittel und
deren Verwendung zur Erhöhung der natürlichen Immunresistenz und/oder in der Tumor-Therapie.**

㉑ Es werden Mistellektinkonzentrate mit einem hohen Anteil an immunologisch aktiven galaktoidspezifischen Mistellektinen sowie entsprechende stabilisierte und standardisierte immunologisch aktive Mistellektinpräparate beschrieben, es wird die Herstellung der Mistellektin-Konzentrate mittels eines zweistufigen Fraktionierungsverfahrens beschrieben, ferner die Herstellung der Mistellektin-Fraktionen enthaltenden Mistellektin-Präparate. Diese Mistellektin-Präparate weisen einen definierten hohen Gehalt an immunologisch aktiven galaktoidspezifischen Mistellektinen und eine definierte biologische Aktivität auf und erlauben dementsprechend eine exakt einstellbare und auf den jeweiligen Behandlungszweck abgestimmte Dosierung. Sie werden vorteilhaft zur Erhöhung der natürlichen Immunresistenz bei Menschen und Säugetieren und/oder für die Tumor-Therapie verwendet.

EP 0 602 686 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 93 12 0461

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE															
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.CLS)												
X,P	DE-U-92 08 913 (HANS JOACHIM GABIUS ET AL) * Ansprüche 1-8 * * Seite 3, Absatz 4.1.1 * ---	1-3,16, 17	A61K35/78 A61K45/05												
X,D	CANCER RESEARCH, Bd.49, Nr.17, 1. September 1989, USA Seiten 4803 - 4808 T. HAJTO ET AL 'Modulatory Potency of the beta-Galactoside-specific Lectin from Mistletoe Extract (Iscador) on the Host Defence System in Vivo in Rabbits and Patients' * Zusammenfassung * ---	1,16,17													
X,D	CANCER RESEARCH, Bd.50, Nr.10, 15. Mai 1990, USA Seiten 3322 - 3326 T. HAJTO ET AL 'Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor alpha, Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells exposed to beta-Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract' * Zusammenfassung * ---	1,16,17													
A,D	DATABASE WPI Week 8636, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 86-232840 & DD-A-235 418 (STAATLICHES INST IM) 7. Mai 1986 * Zusammenfassung * ---	1-17	C07K A61K B01D												
A	DE-A-38 01 391 (BERKEFELD-FILTER ANLAGENBAU GMBH) * das ganze Dokument * -----	4-15													
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1"> <tr> <td>Recherchensort BERLIN</td> <td>Abschlußdatum der Recherche 20. Februar 1995</td> <td>Prüfer Siatou, E</td> </tr> <tr> <td colspan="3">KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderer Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument </td> </tr> </table>				Recherchensort BERLIN	Abschlußdatum der Recherche 20. Februar 1995	Prüfer Siatou, E	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderer Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
Recherchensort BERLIN	Abschlußdatum der Recherche 20. Februar 1995	Prüfer Siatou, E													
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE															
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur															
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderer Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument															